Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 21, No. 1, Mar.-Apr., 2025, p. 29-45

# Preparation of Nanoniosomes at different Cholesterol Concentrations Using the Thin-film Hydration Method for Nanoencapsulation of Pure Polyphenolic Compounds

**Z. Ganjeh-Soltanabadi[1], R. Shaddel[2*], Y. Zahedi[2]**

1, 2 and 3- M.Sc Graduated and Associate Professor in Food Science & Technology, Department of Food Science & Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: r.shaddel@uma.ac.ir)

| | |
|---|---|
| Received: | 07.07.2024 |
| Revised: | 25.09.2024 |
| Accepted: | 26.09.2024 |
| Available Online: | 16.02.2025 |

**How to cite this article:**
Ganjeh-Soltanabadi, Z., Shaddel, R., & Zahedi, Y. (2025). Preparation of nanoniosomes at different cholesterol concentrations using the thin-film hydration method for nanoencapsulation of pure polyphenolic compounds. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 21*(1), 29-45. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.88833.1344

## Introduction

Nowadays, the attention and desire of consumers to the role of food in health and nutrition has led the manufacturers to produce functional food and researchers to study this field. Polyphenols are secondary metabolites produced by many plants. They have anti-obesity, anti-inflammatory, anti-cancer and antioxidants activities. Despite all the mentioned benefits, due to the vulnerability of phenolic compounds to the environmental conditions and their low bioavailability in the digestive system, efforts have been made to encapsulate them with nanoniosomes. Encapsulation of polyphenolic compounds with nanoniosomes is an effective way to increase their stability and bioavailability as well ashinder their undesirable taste and smell. Niosomes are class of bi-layered structure formed by hydration of non-ionic surfactant, cholesterol or other amphiphilic molecules. This structure has two hydrophilic and hydrophobic properties, so it has the ability to be encapsulated with different solubility. Fortification food with polyphenols promotes community health. Therefore, the aim of this research was to produce nanoniosomes containing polyphenolic compounds, and to determine their important physical and chemical properties.

## Materials and Methods

In this research, four polyphenol-loaded nanoniosomes were prepared using Span 60 and Tween 80 surfactants with a ratio of 3:1, and cholesterol with the concentration of 0, 10, 20 and 30 (mg/140 mg surfactant) as F1, F2, F3 and F4 treatments respectively. Physicochemical properties of the polyphenol-loaded niosomes (particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, encapsulation efficiency (EE)) were analyzed, and the formulation with the best characteristics was selected based on having the smallest size, less PDI and the highest EE. The selected formula was analyzed for morphology (scanning electron microscope (SEM)) and probably interactions (Fourier transforms infrared spectrometry (FTIR)). Additionally, the ability to preserve polyphenolic compounds as free or inside the nanonisomes during the storage period of 60 days was investigated. Further, the *in vitro* release of polyphenol from niosomes (gastric and intestinal simulated fluid) was also evaluated. The experiment was performed as completely randomized design (CRD) and the obtained data were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA).

## Results and Discussion

Results indicated that the effect of using different amounts of cholesterol on the average particle size (Z-average) of nanonisomes was significant ($p<0.05$). With increasing cholesterol up to 20 mg (F1 to F3), the Z-average decreased, but with further increase to 30 mg (F4), the Z-average increased. Different concentrations of cholesterol showed significant influence on the PDI of nanonisomes. The minimum value was observed for F3 (20 mg cholesterol) and the maximum for F4. The incorporation of cholesterol in the nanonisomes decreased the zeta potential ($p<0.05$), dedicated an increased electrostatical stability of the particle, and the values were in the range of -50.35 to -65.36 mV. The value of EE was in the range of 88-95%, and F3 treatment had the maximum EE. Based on particle size, PDI, zeta potential and EE, F3 was selected as the best nanoparticle for other assays.

According to the FTIR results, there was no change in the spectrum of nanonisome (F3) containing polyphenol peaks, and the polyphenols were properly enclosed in the nanonisomal vesicles without changing its nature. SEM results also showed vesicles with a uniform and appropriate structure. Nanonisome (F3) containing polyphenol was more stable than the control sample (polyphenol) during 60 days of storage at ambient temperature, which indicated the higher potential of nanonisomes to preserve the polyphenolic compounds during storage. The release behavior in the simulated digestive system (gastric and small intestine media) indicated a diffusion-based release system, and the Kopcha model was the best model to describe the release behavior of polyphenol from the fabricated niosomes in the simulated digestive environment.

## Conclusion

According to the results of this research, it is concluded that nanoencapsulation of polyphenols as a rich source of antioxidant properties inside the nanonisomes can be an effective strategy to maintain their nutritional value. These nanonisomes can be utilized to produce functional foods, and the effects of their addition on the physico-chemical properties of a model food can be investigated.

**Keywords**: Antioxidant, Bioactive, Functional, Nanoencapsulation

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

## مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۴، ص. ۴۵-۲۹

# تهیه نانونیوزوم در غلظت‌های مختلف کلسترول با روش هیدراتاسیون لایه نازک برای نانوریزپوشانی ترکیبات پلی‌فنلی خالص

زهره گنجه سلطان‌آبادی[۱]- رضوان شاددل[۲]*- یونس زاهدی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۰۵

## چکیده

هدف از این مطالعه تهیه نانوکپسول‌های نانونیوزومی به‌منظور حفاظت از ترکیبات پلی‌فنلی و سپس ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نانونیوزوم‌های حاصله بود. ۴ فرمول نانوذرات نیوزومی با استفاده از ۱۴۰ میلی‌گرم سورفکتانت‌های غیریونی اسپن ۶۰ و توئین ۸۰ با نسبت ۱:۳ و کلسترول به مقدار ۰ (F1)، ۱۰ (F2)، ۲۰ (F3) و ۳۰ (F4) (۱۴۰ mg/mg سورفکتانت) با استفاده از روش هیدراتاسیون لایه نازک تولید شد. اندازه ذرات، شاخص توزیع اندازه ذرات (PDI)، پتانسیل زتا و بازده ریزپوشانی روی نانونیوزوم‌ها ارزیابی شد. پس از انتخاب نانونیوزوم با بهترین خصوصیات، تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) و پایداری شیمیایی نانونیوزوم‌ها در مدت ۶۰ روز نگهداری بررسی شد. نتایج نشان داد که میانگین اندازه ذرات، PDI و پتانسیل زتا برای فرمول‌های مختلف نانونیوزوم به‌ترتیب در محدوده ۱۰۳/۵-۳۵۴ نانومتر، ۰/۱۷-۰/۹۲ و ۵۰/۳۵- تا ۶۵/۳۶- میلی‌ولت قرار گرفت. مقدار بازده ریزپوشانی در دامنه ۹۵-۸۸٪ واقع شد که تیمار F3 دارای بیشینه بازده بوده و بر اساس اندازه ذرات، PDI و پتانسیل زتا بعنوان نانونیوزوم با بهترین خصوصیات برای سایر آزمون‌ها انتخاب گردید. بر اساس نتایج FTIR در طیف نانونیوزوم (F3) حاوی پلی‌فنل پیک‌ها تغییری نداشت و ترکیب پلی‌فنلی به‌طور مناسبی در ساختار نانونیوزوم بدون تغییر ماهیت محصور شده بود. همچنین نتایج SEM وزیکول‌های با ساختار یکنواخت و مناسب را نشان داد. نانونیوزوم (F3) حاوی پلی‌فنل در مدت ۶۰ روز نگهداری در دمای محیط پایداری بالاتری نسبت به نمونه شاهد (پلی‌فنل) داشت که نشان‌دهنده توانایی بالای نانونیوزوم در حفظ ترکیبات پلی‌فنلی در زمان نگهداری بود و به‌عنوان بهترین نمونه جهت حفاظت از ترکیبات پلی‌فنلی برای تولید غذاهای عملگرا می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. همچنین، بر اساس پروفایل رهایش نانوحامل‌های توسعه‌یافته، بیشتر پلی فنل‌ها در روده کوچک آزاد شدند؛ مدل کوپچا می‌تواند رفتار رهایش پلی‌فنل از نانو حامل‌های ساخته شده را توصیف کند.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی‌اکسیدان، زیست‌فعال، فراسودمند، نانوریزپوشانی

## مقدمه

پلی‌فنل‌ها متابولیت‌های ثانویه موجود در همه گیاهان آوندی هستند که در طول رشد طبیعی آن‌ها یا در پاسخ به شرایط استرس محیطی سنتز می‌شوند (Munin & Edwards-Lévy, 2011). تعداد زیادی از ترکیبات پلی‌فنلی آلی، مصنوعی یا نیمه‌مصنوعی از ترکیب ساده اسیدگالیک تا ترکیبات پیچیده شناخته شده است (Quideau *et al.*, 2011; Vetrani *et al.*, 2014). پلی‌فنل‌ها از جمله فلاونوئیدها، تانن‌ها، لیگنان‌ها و استیلبن‌ها مواد گیاهی آنتی‌اکسیدانی رایج در رژیم غذایی انسان هستند. بسیاری از گیاهان معطر و دارویی، میوه‌ها، سبزیجات، آجیل و دانه‌ها غنی از پلی‌فنل بوده که برای افزایش سلامتی و طول عمر مفید هستند در واقع به نوعی غذا- درو می‌باشند (Mustafa *et al.*, 2020). ترکیبات غذا-دارو اجزایی از ماده غذایی هستند که علاوه بر داشتن خواص تغذیه‌ای پایه، دارای خواص فعالیت بیولوژیکی ارزشمند و سلامتی‌بخش هستند و باعث پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها می‌شوند. مهمترین آن‌ها شامل ویتامین‌ها،

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: r.shaddel@uma.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2024.88833.1344
3- Nutraceutical

کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فلاوونوئیدها، استرول‌ها و اسیدهای چرب ضروری می‌باشند (Williams *et al*., Birben *et al*., 2012 ; 2004). در سال‌های اخیر، انواعی از فعالیت‌های زیستی اسیدهای فنولیک از جمله فعالیت ضد سرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، بازدارندگی در برابر ویروس هپاتیت C، ضد باکتریایی و ضد ویروسی، کاهش آنژین قلبی و فشار خون بالا، اثربخشی در برابر دیابت، بیماری‌های قلبی-عروقی و بیماری نورودژنراتیو[1] گزارش شده است (Shahidi & Yeo, 2016). دریافت پلی‌فنل‌ها با مصرف انواع زیادی از مواد غذایی گیاهی حاصل می‌شود، زیرا منبع اصلی پلی‌فنل‌ها غذاهایی مانند عسل، حبوبات و میوه‌هایی مانند سیب، انار، توت‌فرنگی، شاه‌توت، زغال‌اخته، تمشک، گیلاس، طالبی، انگور، آلو و گلابی هستند. علاوه بر این، سبزیجاتی مانند جعفری، کلم بروکلی، کرفس، کلم و پیاز، چای سبز، چای سفید، چای سیاه، شکلات و همچنین روغن زیتون سرشار از پلی‌فنل هستند ( Birben *et al*., 2012;Williams *et al*., 2004; Mustafa *et al*., 2020 ). پس از مصرف غذا ترکیبات فنلی توسط آنزیم‌ها و شرایط pH از ماتریکس غذایی در دستگاه گوارش آزاد می‌شوند. فنل‌های آزاد شده در روده کوچک جذب و به دنبال آن با ترکیبات دیگر ترکیب می‌شوند و وارد سیستم گردش خون می‌شوند (Shahidi & Yeo, 2016).

ریزپوشانی فرآیندی است که به موجب آن مواد زیست‌فعال در کپسول‌هایی پوشش داده شده و یا به دام می‌افتند تا در برابر شرایط بد محیطی مانند دمای بالا، اکسیژن، نور، تغییرات pH، برهم‌کنش‌های نامطلوب با سایر ترکیبات و غیره محافظت شده تا انتقال هدفمند اجزای زیست فعال بارگذاری شده به محل مورد نظر با میزان مناسب، از طریق انتخاب صحیح دیواره فراهم شود (Lashkari, 2022). در سال‌های اخیر در صنایع غذایی به علت نیاز به افزودن ترکیبات زیست‌فعال در محصولات غذایی ریزپوشانی مورد توجه قرار گرفته است و به‌دلیل حساس بودن ترکیبات زیست فعال به شرایط محیطی، فرآوری موادغذایی و نیز شرایط اسیدی-صفراوی دستگاه گوارش، ریزپوشانی جهت محافظت مؤثر از آن‌ها به کار برده می‌شود (Nedovic *et al*., 2011). سیستم‌های حامل شامل ترکیبات زیست‌فعال ریزپوشانی شده در مواد دیواره هستند. موادی که در تهیه دیواره استفاده می‌شود باید بر پایه اجزای غذایی بوده، زیست‌تخریب‌پذیر باشد و همچنین توانایی تشکیل مانع بین فاز درونی و اطراف را داشته باشد (Sozer & Kokini, 2009). نانوحامل‌های با قابلیت تولید در صنایع غذای شامل انواع بر پایه بیوپلیمرها و لیپیدها (نانولیپوزوم‌ها، نانونیوزوم‌ها، نانوامولسیون‌ها و میکروامولسیون‌ها) می‌باشند. کپسوله کردن ترکیبات زیست‌فعال طبیعی توسط لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها یکی از متداول‌ترین و شناخته‌شده‌ترین روش‌ها جهت بهبود رهایش، جذب، توزیع و زیست‌دسترسی و همچنین تثبیت آن‌ها در برابر طیف وسیعی از مواد است (Gorjian *et al*., 2021).

نانونیوزوم‌ها ذرات کلوئیدی هستند که از مولکول‌های لیپیدی تشکیل شده‌اند و به محض واکنش با آب، به‌صورت غشاهای دولایه‌ای تشکیل می‌شوند. وارد شدن انرژی و نیروی برشی مانند هموژنیزاسیون و سونیکاسیون منجر به تشکیل ساختارهای کروی یا وزیکول‌ها می‌شود (Sguizzato *et al*., 2021). نیوزوم‌ها دارای ساختارهای میکروسکوپی لایه‌ای هستند که از هیدراتاسیون کلسترول با سورفکتانت‌های غیریونی در محیط آبی تهیه می‌شوند و از سیستم‌های مهم دارورسانی و غنی‌سازی غذا می‌باشند. ساختارهای دولایه نیوزم شامل یک فضای توخالی در مرکز است و به‌دلیل هندسه خاص خود می‌توانند مواد زیست‌فعال و یا داروهای آب‌دوست و همچنین آبگریز را در ساختار خود محصور کنند. نیوزوم‌ها مقرون به صرفه‌تر از لیپوزوم‌ها هستند و به‌طور گسترده به‌عنوان جایگزین برای لیپوزوم‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند. آنها از نظر شیمیایی و فیزیکی پایدارتر هستند و ممکن است جذب سلولی بیشتری داشته باشد. علاوه بر این، آن‌ها دارای مزیت‌هایی مانند زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، عدم سمیت و راندمان ریزپوشانی بالا هستند و با دامنه گسترده‌تری از اندازه (۱۰-۱۰۰ نانومتر) قابل تهیه هستند. از لحاظ حلالیت، نیوزوم‌ها طیف وسیع‌تری از ترکیبات شامل انواع هیدروفیل (در داخل یک فاز آبی) و لیپوفیل (در ناحیه به خصوصی در بیرون لایه‌های چربی) را به دام می‌اندازند ( Khoee & Yaghoobian, 2017؛ Imran *et al*., 2016). با وجود این مزایا، نیوزوم‌ها دارای معایبی همچون توده‌ای شدن، نشت ترکیبات ریزپوشانی شده و هیدرولیز می‌باشد (Bhardwaj *et al*., 2020).

علی‌رغم تمام مزایای ذکر شده برای پلی‌فنل‌ها، این ترکیبات به‌دلیل وجود پیوندهای غیراشباع در ساختارهای مولکولی دارای واکنش‌پذیری بالا بوده و تحت شرایط مختلف مانند اکسیژن، دما، نور، تغییرات pH، فعالیت آبی و آنزیم‌ها سریع تجزیه می‌گردند. همچنین، در دستگاه گوارش زیست‌دسترسی کمی داشته و کاملاً جذب نمی‌شوند (Clifford *et al*., 2017; Khan *et al*., 2016 ). علاوه بر اینها، بسیاری از پلی‌فنل‌ها طعم نامطلوبی دارند که باید قبل از ترکیب آن‌ها در مواد غذایی یا داروهای خوراکی پوشانده شود؛ برای غلبه بر این مشکلات، استفاده از نانوحامل‌ها پیشنهاد شده است ( Munin & Edwards-Lévy, 2011). در یک دهه گذشته به‌دلیل مزایا و قابلیت‌های متعدد، تحقیقات انجام شده در زمینه کپسوله‌سازی ترکیبات حساس دارویی و غذایی درون نانونیوزم‌ها به‌منظور حفاظت از ترکیبات مؤثره مانند پلی‌فنل‌ها، افزایش زیست‌دسترسی و پوشاندن

---

1- Neurodegenerative

طعم نامطلوب روند رو به رشدی را تجربه نموده است. بر اساس بررسی منابع تاکنون پژوهش‌های اندکی در مورد نانوریزپوشانی ترکیبات پلی‌فنلی با نانونیوزوم انجام شده است. لذا هدف از این پژوهش تولید نانونیوزوم‌های حاوی ترکیبات پلی‌فنلی از طریق تعیین نسبت مناسب سورفاکتانت به کلسترول در دیواره نیوزوم و سپس تعیین ویژگی‌های مهم فیزیکی و شیمیایی آن‌ها بود.

## مواد و روش‌ها

کلسترول از شرکت سیگما آلدریچ آلمان، فولین سیوکالچو، اسید گالیک، سوربیتان مونواستئارات ۶۰ و پلی‌اکسی اتیلن سوربیتان۸۰ از شرکت مرک آلمان، کلروفرم و کربنات سدیم از شرکت آروین شیمی دلتا و پودر پلی‌فنل از شرکت صنایع غذایی آراد نوین رویش ایرانیان تهیه گردید.

### اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌فنلی

برای رسم منحنی کالیبراسیون، محلول استوک اسیدگالیک در غلظت ۴۰۰ ppm آماده گردید. برای این منظور ۴۰ میلی‌گرم اسیدگالیک با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. سپس، رقت‌های ۲۰۰-۰ میلی‌گرم بر لیتر (۰،۲۵،۵۰،۱۰۰،۱۵۰،۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از آن تهیه و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌های مختلف اسیدگالیک به بالن‌های ۲۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰٪ فولین سیوکالچو کاملا ترکیب شدند؛ سپس به هر کدام ۲ میلی‌لیتر محلول ۷/۵ ٪ کربنات سدیم اضافه شد. این محلول‌ها بصورت کاملاً فویل‌پیچی شده (برای جلوگیری از ورود نور) به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب آن‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Bel Photonics مدلUV-M51، ایتالیا) در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. منحنی کالیبراسیون غلظت اسید گالیک در برابر میزان جذب ترسیم شده و معادله مربوط به آن به‌دست آمد. در مرحله بعد، محلول پلی‌فنل در غلظت ۲۵۲۰ ppm تهیه شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول پلی‌فنل با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱۰٪ فولین سیوکالچو مخلوط شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ ٪ به آن افزوده شد و به‌صورت کاملا فویل پیچ به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. برای تهیه نمونه شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر جایگزین پلی‌فنل شد و سپس فولین سیوکالچو و کربنات سدیم اضافه گردید و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. مقدار ترکیبات فنلی برحسب میلی‌گرم اسید گالیک درگرم پلی‌فنل بر اساس معادله خط منحنی استاندارد اسید گالیک حاصل مشخص گردید (معادله ۱) (Shahidi & Naczk, 2003). در این معادله y جذب نمونه مجهول و x غلظت نمونه مجهول را نشان می دهد:

$$y = 0.0013x \quad (۱)$$

### آماده‌سازی نیوزوم‌های حاوی پلی‌فنل

در این پژوهش از تکنیک هیدراتاسیون لایه نازک به روش علمی و همکاران (Elmi *et al.*, 2021) با کمی تغییرات استفاده شد. برای این منظور مقادیر مشخصی از سورفکتانت‌های غیریونی اسپن ۶۰ و توئین ۸۰، طبق جدول ۱، توزین و به بالن ۵۰ میلی‌لیتر منتقل شد. از آنجایی که نانوذرات نیوزوم به دو صورت با کلسترول و بدون کلسترول سنتز می‌شوند، در نمونه‌های حاوی کلسترول به نسبت تعیین شده کلسترول وزن و به محتویات بالن اضافه شد. در نمونه فاقد کلسترول، فقط مقادیر مشخص شده از مخلوط سورفکتانت‌ها وجود دارد. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر حلال کلروفرم به مخلوط آنها اضافه کرده و با دستگاه تبخیر کننده چرخان (مدل Labtech 400EV– ایتالیا) با حمام آب ۶۰ °C و تعداد چرخش ۹۰ دور در دقیقه حلال کلروفرم تحت شرایط خلا تبخیر گردید. در این مرحله یک فیلم نازک در اطراف دیواره بالن تشکیل می‌شود که حاوی نیوزوم‌های سنتز شده با ابعاد میکرو و به‌صورت وزیکول‌های چند لایه‌ای می‌باشند. پس از آن، مرحله هیدراته کردن نیوزوم‌ها انجام شد؛ برای این منظور ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حاوی ۰/۰۲ گرم پودر پلی‌فنل با دمای ۶۵ °C به بالن دستگاه تبخیر کننده چرخان اضافه شد و هیدراتاسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۹۰ دور در دقیقه بدون خلا انجام شد. محلول حاصل از روتاری اواپراتور جهت یکنواخت‌تر شدن و همگن شدن، توسط دستگاه هموژنایزر تحت همزدن مکانیکی به‌مدت ۱۵ دقیقه و سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس، برای کاهش اندازه ذرات نیوزوم و تبدیل وزیکول‌های چندلایه‌ای به وزیکول‌های تک لایه‌ای از دستگاه اولتراسونیک هموژنایزر (مدل Ultrasonic Homogenizer FAPAN 300 R– ایران) به‌مدت ۱۰دقیقه با ۱ دقیقه فاصله و از حمام یخ برای جلوگیری از آسیب دیدن وزیکول‌ها استفاده شد. در پایان نانوذرات سنتز شده در داخل ویال‌های شیشه‌ای محافظت شده با فویل‌های آلومینیومی در دمای ۴ °C نگهداری شد تا آزمون‌های تعیین اندازه ذرات، پتانسیل زتا، پایداری فیزیکی و شیمیایی و بازده ریزپوشانی انجام گیرد.

**جدول ۱- ترکیبات تشکیل دهنده نانونیوزوم‌های مختلف**

**Table 1- Chemical compositions of different nanoniosomes**

| نمونه<br>Sample | توئین ۸۰ : اسپن ۶۰<br>Span 60 : Tween 80 | پلی‌فنل<br>Polyphenol (mg/140 mg surfactant) | کلسترول<br>Cholestrol (mg/ 140 mg surfactant) |
|---|---|---|---|
| $F_1$ | 3 : 1 | 20 | 0 |
| $F_2$ | 3 : 1 | 20 | 10 |
| $F_3$ | 3 : 1 | 20 | 20 |
| $F_4$ | 3 : 1 | 20 | 30 |

**ارزیابی نانونیوزوم‌های حاوی پلی‌فنل**

**اندازه ذرات، شاخص توزیع ذرات (PDI)[1] و پتانسیل زتا**

متوسط اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات نانونیوزوم‌های تولید شده با استفاده از دستگاه پراکنش پویای نور لیزر[2] (Horiba, SZ-100– ژاپن) اندازه‌گیری شد. برای این منظور ابتدا محلول حاوی نانونیوزوم با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰۰ مخلوط شد. سپس، نمونه درون یک سلول استوانه‌ای ریخته شد و به شکل عمودی در دستگاه قرار گرفت. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی تعیین شد.

**پتانسیل زتا**

برای تعیین پتانسیل زتای نمونه‌های نانونیوزوم از دستگاه زتاسایزر (Horiba, SZ-100 – ژاپن) استفاده شـد. بـرای این منظور، هر یک از نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شد. سپس، نمونه‌ها توسط سرنگی به داخل لولـه موئین (سل) منتقل و لولـه مـوئین در محل مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در دمـای ۲۵°C و توان ۱۴۹ وات انجام شد.

**بازده ریزپوشانی**

جهت اندازه‌گیری بازده ریزپوشانی از روش علمی و همکاران (Elmi *et al.*, 2021) با کمی تغییرات استفاده شد. برای این منظور از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Bel Photonics مدل UV-M51، ایتالیا) بر اساس اندازه‌گیری پلی‌فنل آزاد و به دام افتاده استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نیوزومی را جهت انحلال کامل پلی‌فنل با ۳/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس، برای جدا کردن پلی‌فنل ریزپوشانی شده و آزاد از سانتریفیوژ با ۴۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه استفاده شد که در آخر قسمت ریزپوشانی شده در بالای فیلتر آمیکون و قسمت آزاد نمونه در پایین ظرف قرار گرفت. جهت شکستن دیواره نیوزومی در بخش ریزپوشانی شده از کلروفرم با نسبت ۱ به ۱ استفاده شد. در ادامه بخش ریزپوشانی شده به‌مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. در اثر تکان خوردن کلروفرم در قسمت زیرین نمونه و قسمت ریزپوشانی شده در قسمت بالای فالکون فیلتر آمیکون قرار گرفت که برای تعیین غلظت هر دو قسمت از اسپکتروسکوپی با طول موج ۷۶۵ نانومتر استفاده گردید. همچنین قسمت آزاد نمونه نیز به درون ظرفی منتقل شد و غلظت آن نیز در طول موج ۷۶۵ نانومتر تعیین شد. برای محاسبه درصد ریزپوشانی از رابطه (۲) استفاده گردید:

$$\text{درصد ریزپوشانی} = \frac{\text{مقدار پلی فنل کپسوله‌شده در نانوحامل}}{\text{مقدار پلی فنل کپسوله‌شده در نانو حامل+مقدار پلی‌فنل آزاد}} \times 100 \quad (۲)$$

**پایداری محلول نیوزوم حاوی پلی‌فنل**

پایداری فیزیکی به‌صورت بصری و با بررسی دوفازه شدن محلول‌ها طی دو ماه نگهداری در دمای محیط مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی تأثیر ساختار نیوزوم برای پایداری شیمیایی، ترکیبات فنولی آزاد و کپسوله شده در طی ۶۰ روز نگهداری در دمای ۲۵°C در فواصل زمانی ۱۵ روز توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و با روز اول مقایسه گردید (Pezeshky *et al.*, 2016).

**طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)**

به‌منظور بررسی هرگونه برهمکنش احتمالی، طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه از نیوزوم خالی (بدون پلی‌فنل)، نیوزوم بارگذاری شده با پلی‌فنل و پودر پلی‌فنل و کلسترول توسط اسپکتروفوتومتر FTIR در دامنه $400-4000\ cm^{-1}$ انجام گردید.

**میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)**

به‌منظور بررسی مورفولوژی، تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی از نمونه فرمولاسیون نیوزوم انتخابی حاوی پلی‌فنل انجام گرفت. برای این منظور، یک قطره از محلول نانونیوزومی روی لام قرار داده شد و به‌مدت ۳ ساعت در مجاورت هوا خشک گردید. در

---

1- Polydispersity Index

2- Dynamic light scattering

ادامه لایه‌ی خشک شده توسط ورقه‌ای از طلا با استفاده از دستگاه اسپاترینگ پوشش داده شد و مشاهده و تصویربرداری از ساختار نانونیوزوم‌ها با بزرگنمایی ۳۰ هزار و ۵۰ هزار توسط میکروسکوپ الکترونی انجام شد.

### رهایش برون تنی پلی‌فنل‌ها از نانولیپوزم (مایع شبیه‌سازی شده معده و روده)

مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) بر اساس روش توصیف شده توسط مولاویسی و همکاران (Molaveisi *et al*., 2021) تهیه شد. ابتدا، پلی‌فنل‌ها از طریق سانتریفیوژ با سرعت g ۹۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه جدا شدند. سپس نانولیپوزوم به مایع شبیه‌سازی شده که شامل w/w ٪۰/۲ NaCl و ٪ ۰/۳۲ w/w پپسین مشتق شده از مخاط معده خوک بود، اضافه شد. نانولیپوزوم و SGF به نسبت ۲:۱ در pH ۲ مخلوط شدند. مخلوط حاصل در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت تکان دادن قرار گرفت (Molaveisi *et al*., 2021). در فواصل زمانی مختلف، نمونه‌ها از مخلوط جمع‌آوری شدند و رهایش پلی‌فنل با قرار دادن لوله‌های اپندورف در آب سرد متوقف شد. غلظت پلی‌فنل آزاد شده با استفاده از اسپکتروفتومتری و اندازه‌گیری‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر تعیین شد. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شدند.

رهایش پلی‌فنل در مایع شبیه‌سازی شده روده (SIF) بر اساس روش پیشنهادی توسط سیدآبادی و همکاران (Seyedabadi *et al*., 2021) ارزیابی شد. بخشی از محیط SGF که قبلاً هضم شده بود، در SIF که شامل ٪ ۰/۵ w/v Tween® 80، $CaCl_2$ 30 mM، 1% w/w پانکراتین از پانکراس خوک، ٪۰/۵ w/w نمک‌های صفراوی و 25mM پتاسیم دی هیدروژن فسفات در pH ۶/۸ بود، انکوبه و مجدداً استفاده شد. مخلوط در حمام آب تکان‌دهنده با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت تکان دادن ۱۷۰ دور در دقیقه قرار گرفت. در فواصل زمانی مختلف، نمونه‌ها از مخلوط انکوبه شده جمع‌آوری شدند و فرآیند هیدرولیز با قرار دادن لوله‌های اپندورف در حمام آب یخ به‌مدت ۱۵ دقیقه متوقف شد. سپس نمونه‌ها دو مرحله سانتریفیوژ شدند: مرحله اول با سرعت g ۹۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه برای حذف ذرات رسوبی، و مرحله دوم با سانتریفیوژ کردن سوپرناتان حاوی پلی‌فنل آزاد با سرعت g ۳۳۰۰ به‌مدت تقریباً ۲۰ دقیقه. در نهایت، سوپرناتان از طریق فیلتر غشایی (Vivaspin® 6، MWCO 100 kDa؛ Cytiva، ایتالیا) فیلتر شد. محتوای پلی‌قنل با استفاده از اسپکتروفتومتری و اندازه‌گیری‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر تعیین شد (Seyedabadi*et al*., 2021).

### تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. آنالیز واریانس یک طرفه داده‌های حاصل از آزمون‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شده و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ٪۹۵ مقایسه گردید. برای رسم نمودارها نیز نرم‌افزار Excel مورد استفاده قرار گرفت.

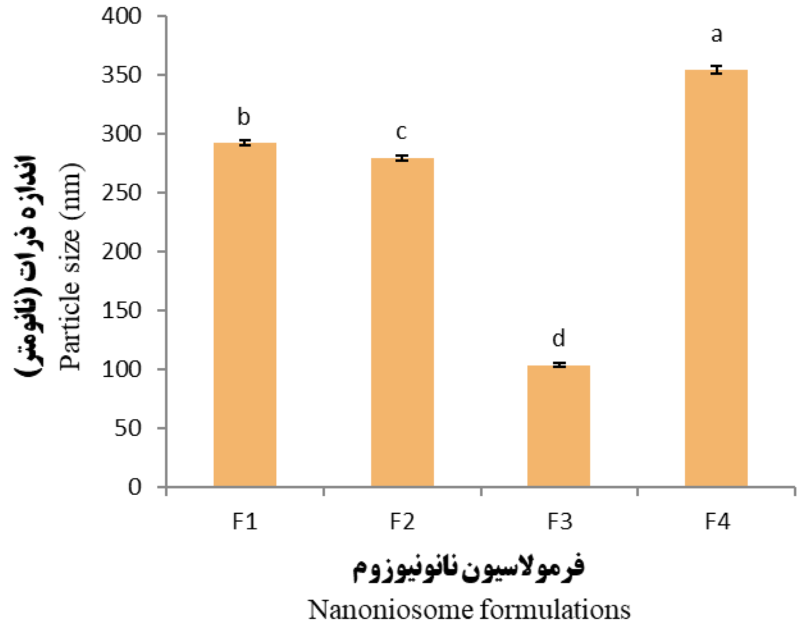
## نتایج و بحث

### اندازه ذرات نانونیوزوم‌ها

بر اساس نتایج بدست آمده تأثیر استفاده از مقادیر مختلف کلسترول بر میانگین اندازه ذرات (Z-Average) نانونیوزوم‌ها معنی‌دار بود ($P<0/05$). اندازه ذرات پارامتر مهمی در مواد غذایی است که مستقیماً بر خصوصیات ظاهری، خصوصیات حسی، پایداری، بازده ریزپوشانی (EE)، مشخصات رهاسازی و عملکرد بیولوژیکی آن (افزایش جذب خوراکی ریز مغذی به دام افتاده در نانونیوزم) مؤثر است (Danaee *et al*., 2015). از عوامل تأثیرگذار در کاهش اندازه ذرات نیوزوم‌ها نوع اولتراسونیک مورد استفاده می‌باشد. جهت بررسی تأثیر محتوای کلسترول بر میانگین اندازه ذرات نیوزوم‌ها، فرمولاسیون‌های مختلف تهیه و اندازه ذرات بررسی گردیده است. نتایج بررسی اندازه ذرات در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین قطر هیدرودینامیکی ذرات، همان اندازه ذرات را نشان می‌دهد، کوچکترین و بزرگترین اندازه ذرات تولید شده در این پژوهش به‌ترتیب ۱۰۳/۵±۱/۲۷ و ۳۵۴/۲±۲/۱۱ نانومتر بود که در محدوده مناسب ذرات نانو قرار دارد و می‌توانند ویژگی‌های منحصر به فرد نانوذرات را نشان دهند. این اندازه‌ها به‌دلیل شرایط خاص تولید و فرآوری ذرات به‌دست آمده‌اند و می‌توانند در کاربردهای مختلف صنایع غذایی مفید باشند.

همانطور که در نتایج مشاهده می‌شود، استفاده از کلسترول تا mg ۲۰ در فرمول نانونیوزم (F1 تا F3)، میانگین اندازه ذرات کاهش‌یافته است اما با افزایش میزان کلسترول به mg ۳۰ (F4)، میانگین اندازه ذرات بیشتر شده است. افزودن کلسترول می‌تواند آبگریزی دو لایه را افزایش دهد و منجر به کاهش انرژی آزاد سطح و در نتیجه کاهش اندازه ذرات شود با این حال، از طرف دیگر، کلسترول می‌تواند مشابه مواد هسته فعال عمل کند و حجم وزیکول‌ها را در غلظت بالا افزایش دهد (Pezeshky *et al*., 2016; Nowroozi *et al*., 2018 ). علاوه بر این، کلسترول به‌دلیل نقش پایدارکنندگی که روی ساختار لایه‌ای در نیوزوم‌ها دارد، سبب افزایش پایداری وزیکول‌ها در مقابل امواج فراصوت می‌شود. بنابراین فراصوت قادر است در غلظت‌های پایین کاسترول به‌طور مؤثری اندازۀ ذرات نیوزوم‌ها را کاهش دهد بدون آنکه آسیبی به نیوزوم وارد شود. اما در غلظت‌های بالای کلسترول

به‌دلیل سختی مولکول آن می‌تواند اثر پایدارکنندگی کلسترول از بین رود و ذرات درشتی تشکیل شوند (Maqamikia *et al*., 2021). بطور مشابهی پاتل و همکاران (Patel *et al*., 2012) مشاهده نمودند در نانونیوزم‌های تهیه شده از اسپان ۴۰ با افزایش غلظت کلسترول در غشای نانونیوزومی در ابتدا اندازه وزیکول‌ها از ۱۶۹ به ۱۰۵ نانومتر رسیده و سپس مجددا تا ۱۱۴ نانومتر افزایش یافت. در تحقیقی افزایش غلظت کلسترول در حضور امولسیفایر اسپان ۶۰ در ابتدا منجر به کاهش اندازه نانونیوزمی و با بیشتر شدن سطح کلسترول قطر نانونیوزم‌ها دچار افزایش گردید ولی در مورد امولسیفایرهای اسپان ۸۰، توئین ۲۰ و توئین ۸۰ روند افزایشی اندازه نانونیوزم‌ها با بیشتر شدن مقدار کلسترول ثبت گردید (Ravaghi *et al*., 2016). در تحقیق دیگری، مقامی‌کیا و همکاران (Maqamikia *et al*., 2021) گزارش نمودند در حضور اسپان ۶۰ افزایش کلسترول سبب افزایش اندازه نانونیوزم‌ها و در صورت استفاده از توئین ۲۰ و یا ۸۰ با افزایش کلسترول اندازه نانونیوزم‌ها کاهش خواهد یافت.




**شکل ۱- اندازه ذرات نمونه‌های نانونیوزوم تهیه شده با سورفکتانت‌های اسپن ٦۰ و توئین ۸۰ با نسبت ۱:۳ و کلسترول به مقدار mg ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰**

(حروف متفاوت روی هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p<0.05$))

**Fig. 1. The particle size of nanonisome samples prepared with Span 60 and Tween 80 surfactants with a ratio of 1:3 and cholesterol in the amount of 0, 10, 20 and 30 mg.**

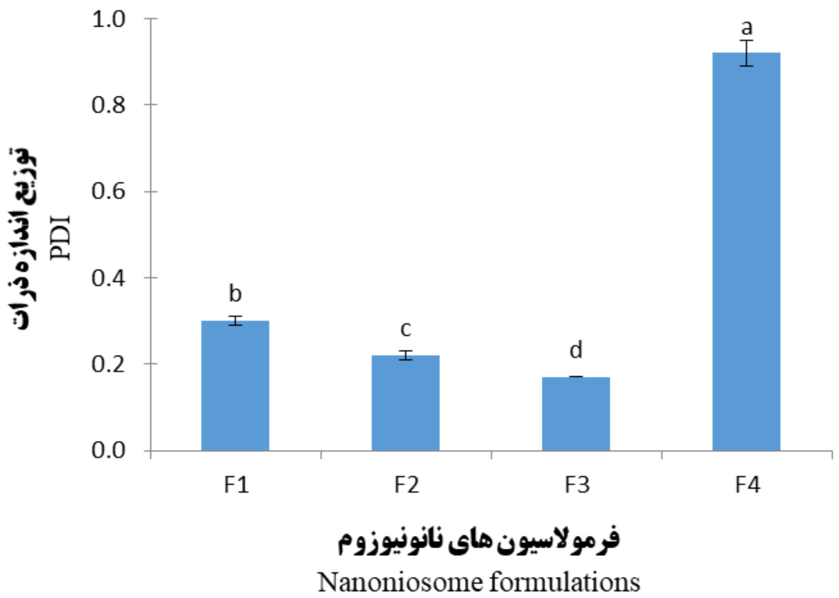
Different letters on the top of bars indicate significant differences ($p<0.05$)

### توزیع اندازه ذرات (PDI)

بر اساس نتایج بدست آمده تأثیر استفاده از مقادیر مختلف کلسترول بر شاخص توزیع اندازه ذرات (PDI) نانونیوزوم‌ها معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). همانطور که در شکل ۲ ملاحظه می‌گردد مقادیر PDI در محدوده ۰/۱۷-۰/۹۲ می‌باشد. کمترین مقدار در نمونه حاوی mg ۲۰ کلسترول (F3) و بیشترین مقدار برای نمونه حاوی mg ۳۰ کلسترول (F4) مشاهده شد. شاخص پایین PDI بیانگر یکنواختی توزیع ذرات می‌باشد و PDI در حدود ۰/۲ مقدار قابل قبول برای توزیع مناسب خواهد بود. سیستم‌هایی که دارای شاخص PDI کمتر از ۰/۲ می‌باشند تحت عنوان سیستم‌های یکپارچه یا مونودیسپرس شناخته می‌شوند که از پایداری قابل توجهی طی دوره نگهداری برخوردار خواهند بود.

اضافه کردن mg ۲۰ کلسترول توزیع اندازه ذرات را یکنواخت‌تر نمود به‌طوری‌که در این نمونه شاخص PDI ۰/۱۷ بود، اما افزایش کلسترول تا mg ۳۰ سبب افزایش توزیع اندازه ذرات شد. کلسترول به‌دلیل نقش پایدارکنندگی که روی ساختار لایه‌ای در نیوزوم‌ها دارد، سبب افزایش پایداری می‌شود. اما در غلظت‌های بالای کلسترول به‌دلیل سختی مولکول آن می‌تواند اثر پایدارکنندگی کلسترول از بین

رود و ذرات درشتی تشکیل شوند (Essa, 2010). همان‌طورکه بیان شد این رفتارها ممکن است ناشی از نقش پایدارکنندگی کلسترول در مقادیر پایین‌تر نسبت به مقادیر بالاتر در فرمولاسیون نیوزوم‌ها می‌باشد. نتایج مشابه با سایر محققن گزارش شده است؛ مقامی‌کیا و همکاران (Maqamikia *et al.*, 2021) در پژوهش خود نشان دادند با افزایش نسبت مولی کلسترول به امولسیفایر، توزیع اندازهٔ ذرات و نیز شاخص پراکندگی افزایش می‌یابد. همچنین، شاخص PDI برای نیوزوم‌های تهیه شده در این پژوهش در محدودهٔ ۰/۱۸ تا ۰/۷۲ بود..




**شکل ۲- اندازه ذرات نمونه‌های نانونیوزوم تهیه شده باسورفکتانت‌های اسپن ٦٠ و توئین ٨٠ با نسبت ۱:۳ و کلسترول به مقدار mg ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰**

(حروف متفاوت روی هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<0.05))

**Fig. 2. Polydispersity index (PDI) of nanonisome samples prepared with Span 60 and Tween 80 surfactants with a ratio of 1:3 and cholesterol in the amount of 0, 10, 20 and 30 mg.**

Different letters on the top of bars indicate significant differences (p<0.05)

## پتانسیل زتا

بررسی نتایج بدست آمده استفاده از مقادیر مختلف کلسترول در فرمول‌های مختلف نانونیوزوم‌ها بر میزان پتانسیل زتا، تفاوت معنی‌داری در سطح معنی‌داری مشاهده شد (P< ۰/۰۵). پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون‌ها است که بار کلی ذره در یک محیط مایع را نشان می‌دهد و شامل اختلاف پتانسیل بین لایه یونی متحرک و لایه غیرمتحرک می‌باشد زیرا نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره است. آگاهی از پتانسیل زتا می‌تواند به کنترل تجمع و همجوشی نانولیپوزوم‌ها که از عوامل مؤثر بر پایداری سیستم‌های لیپوزوم هستند کمک کند (Mozafari, 2010). مقادیر پتانسیل زتای منفی می‌تواند برهمکنش دافعه‌ای بین ذرات ایجاد کرده و از تجمع جلوگیری کند که نشان‌دهنده پایداری فیزیکی خوب سیستم است. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود استفاده از کلسترول در فرمولاسیون نانونیوزوم سبب کاهش پتانسیل زتا در نانونیوزوم‌ها گردید اما بین نانونیوزوم‌های حاوی ۲۰ و ۳۰mg کلسترول تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). مقدار پتانسیل زتا در این پژوهش در دامنه ۵۰/۳۵- تا ۶۵/۶- میلی‌ولت به‌دست آمده است. نانونیوزوم‌هایی با مقادیر پتانسیل زتا بالاتر از۳۰+ میلی‌ولت یا کمتر از ۳۰- میلی‌ولت، پایداری الکترواستاتیکی طولانی‌مدت از خود نشان می‌دهند (Gorjian *et al.*, 2021). پایداری ذرات به علت برهمکنش‌های جذبی مانند جاذبه الکتروستاتیک از بین می‌رود. وزیکول‌های لیپیدی به علت خواص ترمودینامیکی دارای ساختار ناپایدار هستند و طی دوره نگهداری ممکن است توده‌ای شده و رسوب کنند، با تشدید دافعه بین‌مولکولی و همچنین تشدید دافعه الکتروستاتیک، این امکان وجود دارد که از توده‌ای شدن و تشکیل

وزیکول‌های بزرگتر ممانعت شود. در صورت پوشش دادن سطح ویزکول‌ها با موادی که دارای بار یکسان هستند می‌توان دافعه الکتروستاتیکی کافی برای جلوگیری از توده‌ای شدن وزیکول‌ها را ایجاد کرد (Briuglia *et al.*, 2015). علاوه بر این، نشان داده شده که وزیکول‌های آنیونی (مانند استفاده از کلسترول) به‌طور مؤثرتر و سریع‌تری توسط سلول‌ها نسبت به وزیکول‌های خنثی[1] جذب می‌شوند. کلسترول از جمله مواد غیرسمی، بی خطر و ارزان قیمتی است که می‌تواند دافعه الکتروستاتیک ایجاد کرده و به‌عنوان پایدار کننده نانونیوزم استفاده شود، عواملی مانند نوع و مقدار پایدارکننده (کلسترول)، نوع و غلظت ماده فعال (پلی‌فنل) و نوع یون‌های موجود در محلول، تأثیر برجسته‌ای بر پتانسیل زتا نانونیوزم‌ها دارند دلیل پایداری نانونیوزم با اضافه شدن کلسترول را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که گروه هیدروکسیل مستقر در سر کلسترول یک پیوند هیدروژنی با پلی‌فنل (دارای بار مثبت) ایجاد کند و آنرا به داخل غشا سوق دهد و بار منفی موجود در سورفکتانت استفاده شده (توئین و اسپن) به سطح غشا کشیده شود و بدنبال آن بار منفی بیشتر شده و باعث دفع الکترواستاتیک ذرات شود (Nakhaei *et al.*, 2021).

**جدول ۲- مقادیر پتانسیل زتا برای نانونیوزوم‌های مختلف**

**Table 2- Zeta potentials of different nanoniosomes**

| نمونه‌های نانونیوزوم Nanoniosomes | پتانسیل زتا Zeta potential (mV) |
|---|---|
| F1 | -50.35 ± 0.51 |
| F2 | -58.42 ± 1.03 |
| F3 | -64.10 ± 0.24 |
| F4 | -65.60 ± 0.85 |

## بازده ریزپوشانی

بازده ریزپوشانی یکی از مهمترین پارامترهای فیزیکی-شیمیایی در بهینه‌سازی فرمولاسیون است. بازده ریزپوشانی بالا، زیست‌دسترسی ترکیبات فعال گیاهی را تضمین می‌کند. بازده ریزپوشانی نانونیوزوم‌ها به پارامترهای مختلفی از جمله روش ساخت نانونیوزوم، نوع سورفکتانت‌ها، شرایط محیطی مانند دما، pH، قدرت یونی، مواد افزودنی و ماهیت ترکیب پوشش داده شده بستگی دارد. بازده ریزپوشانی نیوزوم‌ها اغلب در محدوده ۷۵-۹۰٪ گزارش شده است (Khoee & Yaghoobian, 2017). همانطور که در شکل ۳ مشخص است، اضافه کردن ۲۰mg کلسترول در فرمول نانونیوزوم، باعث بهبود بازده ریزپوشانی پلی‌فنل شده‌است اما با افزایش کلسترول تا ۳۰mg، بازده ریزپوشانی پلی‌فنل کاهش یافته است.کلسترول به علت اثر تثبیت کننده غشاء باعث افزایش بازده ریزپوشانی می‌شود زیرا بین لایه‌های دوتایی توزیع می‌شود، فضای خالی را اشغال می‌کند و سیالیت غشاء را کاهش می‌دهد، بنابراین باعث افزایش بازده ریزپوشانی می‌شود (Chen *et al.*, 2019). راملی و همکاران (Ramli *et al.*, 2021) نیز تایید کردند که افزایش بیش از حد نسبت کلسترول تأثیر منفی بر بازده ریزپوشانی برموموم با استفاده از نانولیپوزوم داشته است. بازده بالای ریزپوشانی در مقادیر کم کلسترول را می‌توان به بهبود پایداری غشا به‌دلیل تاثیر کلسترول بر تقلیل سیالیت غشا نسبت داد و کارایی پایین در نسبت‌های بیشتر کلسترول را به گسیختگی غشا در مقادیر زیاد کلسترول نسبت داد (Fan *et al.*, 2008).

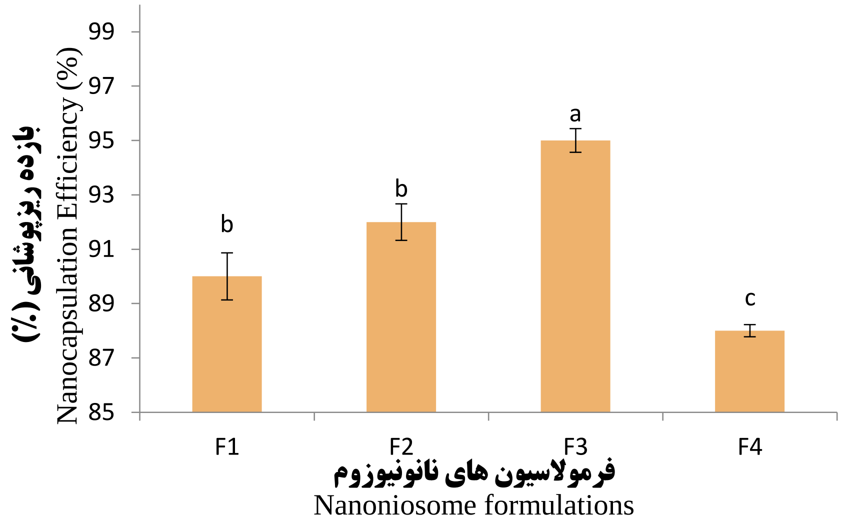
تحقیقات متفاوتی روی تأثیر کلسترول در ترکیب نانونیوزوم بر بازده ریزپوشانی انجام شده است؛ در تحقیق انجام گرفته توسط علمی و همکاران (Elmi *et al.*, 2021) بالاترین بازده ریزپوشانی کوئرستین در نانونیوزوم حاوی ۵ mg فیتوسترول (۹۵/۶۸٪) مشاهده شد، این محققین بیان کردند که ماهیت چربی‌دوست فیتواسترول، سبب قرار دادن آن بین دو لایه چربی‌دوست شده و سفتی غشاء را افزایش داده که احتمالاً منجر به کاهش خروج کوئرستین به محیط بیرونی شده است، با این حال، مقادیر بالاتر فیتواسترول باعث کاهش راندمان ریزپوشانی شد، زیرا مقادیر اضافی فیتواسترول با کوئرستین برای ترکیب در دو لایه آبگریز رقابت می‌کند. رواقی و همکاران (Ravaghi *et al.*, 2016) نیز نشان دادند که کلسترول می‌تواند بازده ریزپوشانی نیوزوم‌های حاوی کانتاگزانتین را افزایش دهد اما مقادیر اضافی کلسترول بازده ریزپوشانی را کاهش می‌دهد. نتایج مشابهی توسط مقسمی و همکاران (Moghassemi *et al.*, 2017) به‌دست آمد؛ آن‌ها نیوزوم های آلبومین سرم گاوی را تهیه و تأثیر کلسترول را با استفاده از درصدهای مختلف (۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰) بررسی کردند و بیان کردند نیوزوم‌های با ۶۰٪ کلسترول بالاترین بازده ریزپوشانی را داشته‌اند اما افزایش غلظت کلسترول بیش از ۶۰٪ باعث کاهش میزان بازده ریزپوشانی شده است. در تحقیق دیگری که بر ریزپوشانی نایسین توسط نانولیپوزوم متمرکز بوده است نتایج نشان داد که کاربرد کلسترول در تشکیل لیپوزوم، مانع گسیختگی غشای لیپوزومی توسط نایسین شده است و از طرفی نیز موجب کاهش بازده ریزپوشانی نایسین در لیپوزوم شده است (Laridi *et al.*, 2003).

با توجه به نتایج بدست آمده از میانگین اندازه ذرات، شاخص توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده ریزپوشانی، نمونه حاوی ۲۰mg کلسترول (F3) به‌عنوان نمونه نانونیوزوم با بهترین خصوصیات انتخاب گردید. سپس، پایداری در زمان ۶۰ روز نگهداری، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و FTIR برای نانونیوزوم انتخابی بررسی شد.

1- Zwitterion

### پایداری پلی‌فنل

ریزپوشانی مواد زیست‌فعال در مقیاس نانو رویکردی است که باعث حفاظت بهتر مواد حساس، زیست فراهمی بالاتر آن‌ها، انحلال مواد آبگریز در محیط‌های آبی، کنترل اثرات طعمی و رنگی مواد زیست‌فعال و رهایش کنترل شده این مواد می‌گردد. بنابراین زمانی می‌توان ادعا کرد ریزپوشانی مواد زیست‌فعال موفق بوده است که ذرات حاصله در گذر زمان تا حد زیادی خاصیت اولیه خود را حفظ کنند. پایداری نیوزوم تحت تأثیر چندین پارامتر از جمله اندازه ذرات، PDI، اختلاف پتانسیل زتا، ظرفیت محصور شده و نوع سورفکتانت است (Khoee & Yaghoobian, 2017).

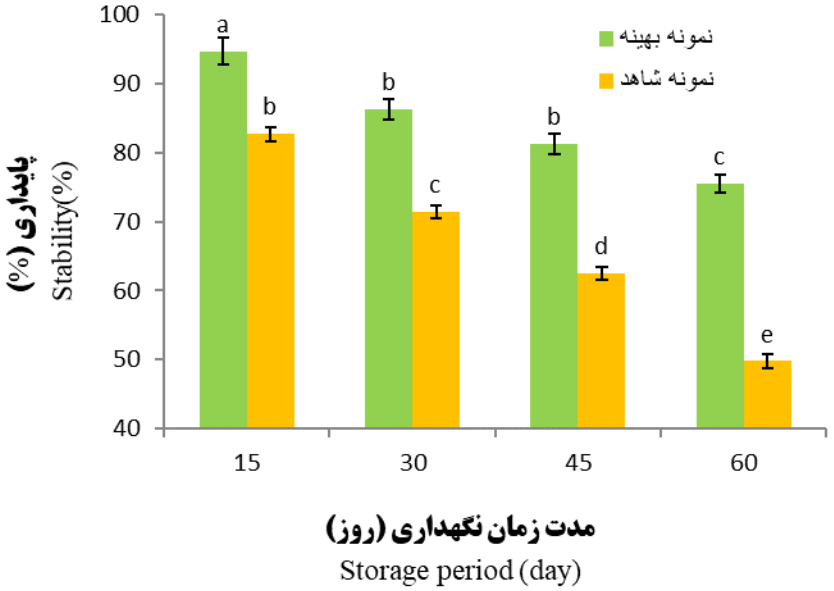



**شکل ۳- راندمان نانوکپسولاسیون (٪) نمونه‌های نانونیوزوم بارگذاری شده با پلی‌فنل‌ها**

(حروف متفاوت روی هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<0.05))

**Fig. 3. Nanoencapsulation efficiency (%) of nanonisome samples loaded with polyphenols**

Different letters on the top of bars indicate significant differences (p<0.05)




**شکل ٤- پایداری پلی‌فنل‌ها و نانونیوزوم‌های بارگذاری شده با پلی‌فنل‌ها در مدت دو ماه نگهداری**

(حروف متفاوت روی هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<0.05))

**Fig. 4. Stability of polyphenols and nanonisomes-loaded polyphenols during two months of storage**

Different letters on the top of bars indicate significant differences (p<0.05)

در این تحقیق پایداری نانونیوزم حاوی پلی‌فنل با نمونه شاهد طی یک دوره ۶۰ روزه در دمای محیط بررسی شد. نانونیوزوم حاوی پلی‌فنل پایداری خوبی از خود نشان داده و دوفازه شدن نسبت به نمونه شاهد کمتر روی داد (شکل ۴). وجود کلسترول در غشای نانونیوزم باعث کاهش نزدیکی و مجاورت پلی‌فنل با غشای نانونیوزوم شده و در نتیجه باعث حفظ پایداری نانونیوزوم گردید.

انبوهش[1] و سپس درهم‌آمیختگی[2] علت اصلی ناپایداری و افزایش اندازهٔ ذرات هستند، بنابراین مهمترین فرآیندی که موجب ناپایداری سیستم‌های کلوئیدی می‌گردد، انبوهش ذرات در طول دوره نگهداری است (Pezeshky *et al*., 2016). نیروهای جذبی بین ذرات موجب چسبیدگی ذرات به یکدیگر شده و در نهایت ساختارهای بزرگتری تشکیل می‌شود و اگر فرایندهای ته‌نشینی و شناور شدن ذرات نانونیوزومی در زمان نگهداری سیستم اتفاق بیفتد، نشانگر توده شدن ذرات است. در رابطه با اثر کلسترول بر پایداری ذرات می‌توان چنین گفت که کلسترول در مقادیر بهینه با افزایش سفتی غشا و ارتقا پتانسیل زتا، باعث افزایش دافعه الکترواستاتیک بین ذرات می‌شود و از فرایند به هم‌آمیختگی ذرات ممانعت می‌کند و باعث بهبود پایداری ذرات می‌گردد (Bang *et al*., 2011). این نتایج در تحقیقات گذشته نیز تأیید شد که روش ریزپوشانی انتخابی یک تکنیک رضایت بخش برای تثبیت و افزایش ماندگاری ترکیبات زیست‌فعال بود. در واقع، ریزپوشانی می‌تواند یک سد محافظ در برابر اکسیژن، نور، گرما و رطوبت ایجاد کند که دلایل اصلی بی‌ثباتی ترکیبات زیست‌فعال هستند (Shaddel *et al*., 2018). امجدی و همکاران (Amjadi *et al*., 2018 ) در تحقیقی به این نتیجه رسیدند که پایداری بتانین در پاستیل حاوی بتانین انکپسوله شده با نانولیپوزوم بیشتر از پاستیل حاوی بتانین آزاد بوده و پایداری بتانین در این نمونه‌ها بخاطر اثر حفاظتی نانولیپوزوم در برابر اکسایش و هیدرولیز در مدت زمان نگهداری از ۹۶٪ به ۸۹٪ کاهش یافت در حالی‌که در پاستیل حاوی بتانین آزاد میزان پایداری از ۸۴٪ به ۴۱٪ تقلیل پیدا کرد.

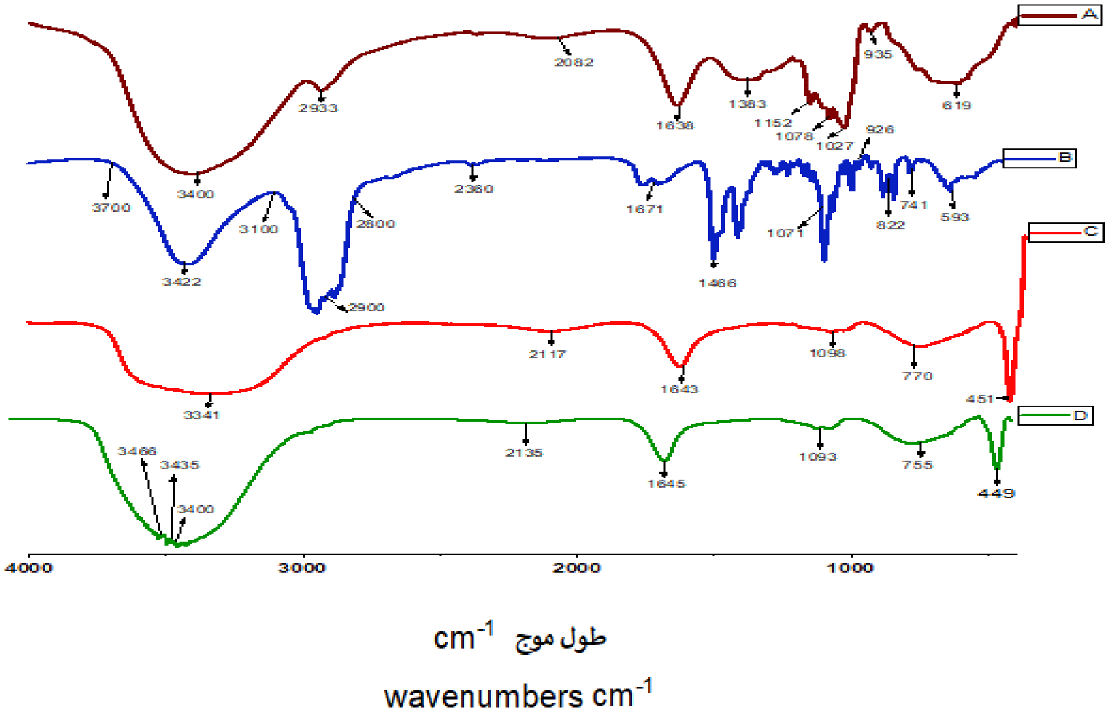
## طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

آزمون FTIR روش مطلوبی جهت تعیین و تفکیک ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی موجود در مواد می‌باشد. اصول شناسایی گروه‌های عاملی در این آزمون به‌صورت کیفی است، به‌گونه‌ای که با اندازه‌گیری و ثبت شدت جذب در پیک‌های منحنی (طول موج شدت جذب) امکان شناسایی ترکیبات و بر همکنش‌های آن‌ها وجود دارد. بر اساس این اصل که گروه‌های عاملی شدت جذب مشخصی در فرکانس‌های مشخص دارند، چناچه در ساختار ترکیبات تغییراتی رخ دهد طول موج‌های دارای پیک و شدت جذب در آن‌ها تغییر خواهد کرد. در این پژوهش در ابتدا طیف جذب در محدوده فراسرخ IR برای پودر پلی‌فنل و کلسترول رسم شد و گروه‌های عاملی موجود معرفی گردید و در ادامه طیف جذب در محدوده فراسرخ برای نانونیوزم خالی و نانونیوزوم حاوی پلی‌فنل با یکدیگر مقایسه شد (شکل ۵). در ساختار کلسترول، ارتعاش کششی از گروه‌های هیدروکسیل به‌صورت کششی در طول موج محدوده $cm^{-1}$ ۳۱۰۰–۳۷۰۰ همچنین گروه عاملی متیلی آزاد (ارتعاشات کششی نامتقارن پیوند C=C، CH3 و CH2) در محدوده $cm^{-1}$ ۲۸۰۰ تا ۲۹۰۰ $cm^{-1}$ قابل مشاهده هستند. همچنین، پیک‌های ۱۰۵۷ و ۸۴۰ نیز به ترتیب مربوط به حلقه کلسترول و پیوند کششی C-C-Cدر مولکول کلسترول هستند. در ساختار پلی‌فنل، پیک‌های $cm^{-1}$ ۳۴۰۰ و $cm^{-1}$ ۱۶۳۸ به‌ترتیب مربوط به ارتعاش کششی O-H و C=O گروه فنلی بوده، $cm^{-1}$ ۱۳۸۳ (C-O الکل)، $cm^{-1}$ ۱۱۵۹ (OH آروماتیک)،$cm^{-1}$ ۱۰۷۸ (گروه‌های اولیه OH)، $cm^{-1}$ ۱۰۲۷ (C-O الکل) و $cm^{-1}$ ۱۱۵۲ مربوط به گروه استری C-O-C در پلی‌فنل‌هاست هستند. مقایسه در طیف FTIR نانونیوزم خالی و نشان می‌دهد که نانونیوزم خالی پیک‌های مشابه طیف کلسترول مشاهده می‌شود و فاقد پیک‌های مربوط به پلی‌فنل است اما در نانونیوزوم حاوی پلی‌فنل پیک‌های مشخص مربوط به کلسترول و هم پلی‌فنل قابل مشاهده‌است، چناچه در این طیف طول موج $cm^{-1}$ ۱۶۴۳ مربوط به گروهای آروماتیک می‌باشد. در ساختار نانونیوزوم حاوی پلی‌فنل عدم وجود پیک‌های مربوط به پودر پلی‌فنل در مناطق $cm^{-1}$ ۱۶۳۸، ۱۳۸۳،۱۱۵۲، ۱۰۷۸، ۱۰۲۷ ریزپوشانی پودر پلی‌فنل را در نانونیوزوم‌ها نشان می‌دهد. همچنین وجود پیک‌های $cm^{-1}$ ۳۴۶۶ و ۳۴۳۵ در ساختار نیوزوم، احتمالاً در نتیجه برهمکنش پلی‌فنل با مواد دیواره نانونیوزوم و تاییدی بر ریزپوشانی موفقیت‌آمیز پلی‌فنل در نانونیوزوم باشد. علاوه‌بر جابجایی‌ها، شدت و شکل پیک‌ها نیز تغییر کرد. واضح‌ترین تغییرات طیفی مربوط به نوار کششی $cm^{-1}$ ۱۶۴۵ است بود که پس از ریزپوشانی واضح‌تر شد.

## آنالیز تصاویر SEM

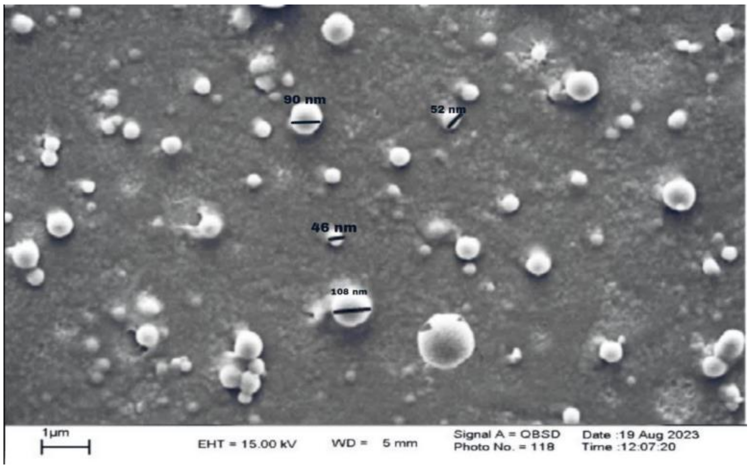
به‌منظور ارزیابی شکل و اندازه نانونیوزوم حاوی پلی‌فنل، تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه گردید. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود ساختار ذرات به‌صورت تقریبا کروی است و اندازه‌ی اکثر آنها زیر ۲۰۰ nm می‌باشد که با نتایج مربوط به اندازه‌گیری ذرات با استفاده از روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) مطابقت دارد. همچنین، دارای شکل کروی و تقریباً بیضوی و سطح نسبتاً صاف می‌باشند.

1- Flocculation
2- Coalescence




**شکل ۵- نتایج آنالیز FTIR (A=پلی‌فنول، B= کلسترول، C=نانونیوزوم انتخابی خالی (F3) ، D=نانونیوزوم انتخابی حاوی پلی‌فنول)**

**Fig. 6. FTIR spectra for A = polyphenol, B = cholesterol, C = blank nanoniosome (F3), and D = polyphenol -loaded nanoniosome**




**شکل ٦- تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانونیوزوم‌های انتخابی بارگذاری شده با پلی‌فنل‌ها**

**Fig. 7. SEM image of polyphenol -loaded nanoniosomes F3**

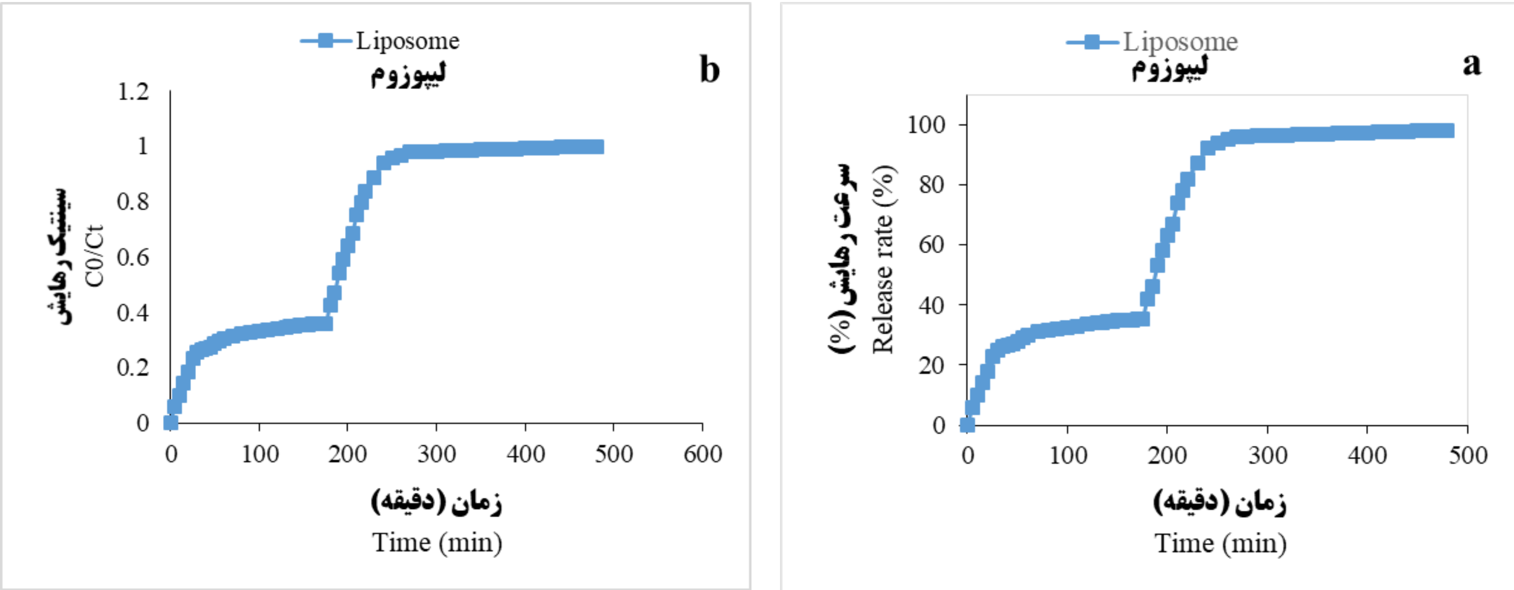
### سنتیک رهایش

شکل ۷a پروفایل رهایش پلی‌فنل از نانونیوزوم انتخابی در مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) و مایع شبیه‌سازی شده روده (SIF) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را نشان می‌دهد. مطالعه رهایش برون‌تنی نشان داد که نرخ رهایش در SGF برای نانونیوزوم انتخابی تدریجی بود. در مورد نانونیوزوم، تقریباً ۳۳/۵ درصد از پلی‌فنل در SGF رها شد. این نشان‌دهنده نگهداری بیشتر پلی‌فنل در نانونیوزوم‌ها است. رفتار رهایش در SIF نیز روند مشابهی با SGF داشت و رهایش تدریجی در آن نیز مشاهده شد. در SIF، تقریباً ۶۴/۵ درصد از کل پلی‌فنل از حامل نانونیوزوم رها شد. به‌طور کلی، حامل نانونیوزوم در

طول فرآیند هضم حدود ۹۸/۱ درصد از کل پلی‌فنل را در مایع هضم شبیه‌سازی شده رها کرد.

در شکل b۷، درصد رهایش و مدلسازی سینتیک رهایش پلی‌فنل از نانونیوزوم انتخابی در مایع هضم شبیه‌سازی شده (SGF و SIF) در منحنی پیوسته نشان داده شده است. برای تعیین مناسبترین مدل برای توصیف رهایش پلی‌فنل از نانونیوزوم در مایع هضم شبیه‌سازی شده، چندین معادله از جمله هیگوچی، ریگر-پپاس، پپاس-ساهلین و کوپچا مورد بررسی قرار گرفتند. معادله کوپچا بالاترین مقدار $R^2$ و کمترین RMSE را نشان داد که نشان‌دهنده بهترین تطابق برای داده‌های رهایش نمونه‌ها بود. در سیستم نانونیوزوم انتخابی، $K_1$ به‌طور مداوم بالاتر از $K_2$ بود. به‌طور خاص، مقادیر $K_1$ برای سیستم نانونیوزوم انتخابی ۰/۰۰۹ بود. مقادیر $K_2$ مربوطه ۰/۰۰۲ بودند که نشان‌دهنده مکانیزم رهایش انتشار است. این نشان می‌دهد که رهایش پایدار پلی‌فنل می‌تواند در طولانی مدت در SIF رخ دهد.

همچنین، مدل‌سازی رهایش و سنتیک پلی‌فنل از نانونیوزوم انتخابی در مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) و مایع شبیه‌سازی شده روده (SIF) در جدول ۳ مشخص شده است.




**شکل ۷- a) پروفایل رهایش پلی‌فنل از نانونیوزوم انتخابی در مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) و مایع شبیه‌سازی شده روده (SIF)؛ b) سینتیک رهایش پلی‌فنل در مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) و مایع شبیه‌سازی شده روده (SIF)**

**Fig. 7. a) Polyphenol release profile from selected nanoniosome in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF), b) Polyphenol release kinetics in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF)**

**جدول ۳- مدل‌سازی رهایش و سنتیک پلی‌فنل از نانونیوزوم انتخابی در مایع شبیه‌سازی شده معده (SGF) و مایع شبیه‌سازی شده روده (SIF)**

**Table 3- Modeling the release and kinetics of polyphenol from selective nanoniosomes in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF)**

| زمان Time (min) | درصد رهایش Release rate (%) | $C_0/C_t$ |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 |
| 25 | 23 | 0.234454638 |
| 50 | 28 | 0.295810398 |
| 100 | 32.5 | 0.326004077 |
| 150 | 34.8 | 0.354740061 |
| 200 | 63 | 0.642201835 |
| 250 | 94 | 0.958205912 |
| 300 | 96.3 | 0.980632008 |
| 350 | 96.8 | 0.985714262 |
| 400 | 97.3 | 0.989846325 |
| 450 | 97.8 | 0.996941896 |

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش نانونیوزوم‌های مختلفی با کمک دو سورفکتانت اسپن ۶۰ و توئین ۲۰ و مقادیر مختلف کلسترول (صفر، ۱۰، ۲۰ و۳۰ میلی‌گرم) در فرمولاسیون نانونیوزوم تهیه شد. نتایج اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بازده ریزپوشانی نشان داد که نانونیوزم‌های حاوی ۲۰ mg کلسترول دارای اندازه ذرات کوچکتر، پتانسیل زتای کمتر، توزیع اندازه ذرات یکنواخت‌تر و بازده ریزپوشانی بیشتر بودند. بنابراین به‌عنوان نمونه نانونیوزوم با بهترین خصوصیات انتخاب گردید. نتایج آزمون‌های FTIR و SEM نیز مؤید شرایط مناسب این نانونیوزوم‌ها بودند. قابلیت حفظ ترکیبات پلی‌فنلی بعنوان موادی ارزشمند و زیست‌فعال بصورت آزاد یا درون نانونیوزوم در مدت زمان نگهداری ۶۰ روز بررسی و حاکی از توانایی بالای نانونیوزوم در نگهداری این ترکیبات بود. در نهایت، رفتار رهایش در سیستم گوارشی شبیه‌سازی شده (محیط معده و روده کوچک) نشان‌دهنده سیستم رهایش مبتنی بر انتشار بود و مدل کوپچا بهترین مدل برای توصیف رفتار رهایش پلی‌فنل از نانونیوزوم‌های ساخته شده در محیط گوارشی شبیه‌سازی شده بود. با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان گفت ریزپوشانی کردن پلی فنل‌ها به‌عنوان یک منبع سرشار از خاصیت آنتی‌اکسیدانی در درون نانونیوزوم‌ها می‌تواند راهکاری مؤثر برای حفظ ارزش غذایی این مواد می‌باشد. در تحقیقات آتی می‌توان از این نانونیوزوم‌ها برای تولید مواد غذایی فراسودمند بهره جست و اثرات افزودن آن‌ها را روی خواص فیزیکی–شیمیایی ماده غذایی مدل بررسی نمود.

## میزان مشارکت

**زهره گنجه سلطان آبادی:** جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل رسمی، تحقیق و بررسی، روش‌شناسی، نرم‌افزار، نوشتن– آماده‌سازی پیش‌نویس اصلی؛ **رضوان شاددل:** مفهوم‌سازی، مدیریت داده‌ها، تأمین مالی، روش‌شناسی، مدیریت پروژه، منابع، نرم‌افزار، نظارت، اعتبارسنجی، تجسم، نوشتن–بررسی و ویرایش؛ **یونس زاهدی:** روش‌شناسی، مدیریت پروژه، منابع، نظارت، اعتبارسنجی، نوشتن–بررسی و ویرایش.

## منابع تأمین مالی

این کار توسط دانشگاه محقق اردبیلی، پشتیبانی مالی شد.

## References


1. Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., & Roufegarinejad, L. (2018). Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry*, *256*, 156-16. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.114
2. Bang, S., Hwang, I., Yu, Y., Kwon, H., Kim, D., & Park, H. (2011). Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of Microencapsulation*, *28*(7), 595-604. https://doi.org/10.3109/02652048.2011.557748
3. Bhardwaj, P., Tripathi, P., Gupta, R., & Pandey, S. (2020). Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *56*, 101581. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101581
4. Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, *5*, 9-19. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101581
5. Briuglia, M.-L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D.A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on *in vitro* drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, *5*, 231-242. https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8
6. Chen, S., Hanning, S., Falconer, J., Locke, M., & Wen, J. (2019). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *144*, 18-39 . https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.015
7. Clifford, T., Constantinou, C.M., Keane, K.M., West, D.J., Howatson, G., & Stevenson, E.J. (2017). The plasma bioavailability of nitrate and betanin from *Beta vulgaris* rubra in humans. *European Journal of Nutrition*, *56*, 1245-1254. https://doi.org/10.1007/s00394-016-1173-5
8. Danaee, M., Farzinebrahimi, R., Kadir, M.A., Sinniah, U.R., Mohamad, R., & Mat Taha, R. (2015). Effects of MeJA and SA elicitation on secondary metabolic activity, antioxidant content and callogenesis in *Phyllanthus pulcher*. *Brazilian Journal of Botany*, *38*, 265-272. https://doi.org/10.1007/s40415-015-0140-3
9. Elmi, N., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A., Sahraee, S., Heshmati, M.K., Hoseini, M., & Pezeshki, A. (2021). Physical properties and stability of quercetin loaded niosomes: stabilizing effects of phytosterol and polyethylene glycol in orange juice model. *Journal of Food Engineering*, *296*, 110463. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110463

10. Essa, E.A. (2010). Effect of formulation and processing variables on the particle size of sorbitan monopalmitate niosomes. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP), 4* (4). https://doi.org/10.22377/ajp.v4i4.289
11. Fan, M., Xu, S., Xia, S., & Zhang, X. (2008). Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and *in vitro* release study. *European Food Research and Technology, 227*, 167-174. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0706-9
12. Gorjian, H., Amiri, Z.R., Milani, J.M., & Khaligh, N.G. (2021). Preparation and characterization of the encapsulated myrtle extract nanoliposome and nanoniosome without using cholesterol and toxic organic solvents: A comparative study. *Food Chemistry, 342*, 128342. https://doi.org/10.1016/j.foodchem. 2020.128342
13. Imran, M., Shah, M.R., Ullah, F., Ullah, S., Elhissi, A.M., Nawaz, W., Ahmad, F., Sadiq, A., & Ali, I. (2016). Glycoside-based niosomal nanocarrier for enhanced *in-vivo* performance of Cefixime. *International Journal of Pharmaceutics*, *505*(1-2), 122-132. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.042
14. Khan, M.I., Madni, A., & Peltonen, L. (2016). Development and *in-vitro* characterization of sorbitan monolaurate and poloxamer 184 based niosomes for oral delivery of diacerein. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *95*, 88-95. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.002
15. Khoee, S., & Yaghoobian, M. (2017). Niosomes: A novel approach in modern drug delivery systems. In Nanostructures for drug delivery (pp. 207-237). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46143-6.00006-3
16. Laridi, R., Kheadr, E., Benech, R.-O., Vuillemard, J., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, *13*(4), 325-336. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00194-2
17. Lashkari H. (2022). Crocin encapsulation in niosome and liposome carriers and investigation of their properties. *Journal of Food Science and Technology (Iran), 19*(128), 171-182. https://doi.org/10.22034/FSCT.19.128.171
18. Lubbers, S., & Guichard, E. (2003). The effects of sugars and pectin on flavour release from a fruit pastille model system. *Food Chemistry, 81*(2), 269-273. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00422-3
19. Maqamikia, H., Hakimzadeh, V., Arianfar, A., Rajabzade, Q., & Shahidi-Noghabi, M. (2021). Improving the stability and bioaccessibility of vitamin D3 in the structure of nanoniosomes designed by different surfactants, *Research and Innovation in Food Science and Technology (JRIFST), 10*(3), 249-260. https://doi.org/10.22101/JRIFST.2020.254761.1195
20. Moghassemi, S., Hadjizadeh, A., & Omidfar, K. (2017). Formulation and characterization of bovine serum albumin-loaded niosome. *Aaps Pharmscitech, 18*, 27-33. https://doi.org/10.1208/s12249-016-0487-1
21. Molaveisi, M., Noghabi, M.S., Parastouei, K., & Taheri, R.A. (2021). Fate of nanophytosomes containing bioactive compounds of Echinacea extract in an acidic food beverage. *Food Structure, 27*, 100177. https://doi.org/10.1016/j.foostr.2021.100177
22. Mozafari, M.R. (2010). Nanoliposomes: preparation and analysis. Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: *Pharmaceutical Nanocarriers*, 29-50. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_2
23. Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharmaceutics, 3*(4), 793-829. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793
24. Mustafa, S.K., Oyouni, A.A.W.A., Aljohani, M.M., & Ahmad, M.A. (2020). Polyphenols more than an Antioxidant: Role and Scope. *Journal of Pure and Applied Microbiology, 14*(1). https://doi.org/10.22207/JPAM.14.1.08
25. Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D.O., Abdelbasset, W.K., Jadidi Kouhbanani, M.A., Varma, R.S., Marofi, F., Jarahian, M., & Beheshtkhoo, N. (2021). Liposomes: structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9*, 705886. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886
26. Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science, 1*, 1806-1815. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265
27. Nowroozi, F., Almasi, A., Javidi, J., Haeri, A., & Dadashzadeh, S. (2018). Effect of surfactant type, cholesterol content and various downsizing methods on the particle size of niosomes. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, *17*(Suppl2), 1. https://doi.org/10.22037/IJPR.2018.2368
28. Pascua, Y., Koç, H., & Foegeding, E.A. (2013). Food structure: Roles of mechanical properties and oral processing in determining sensory texture of soft materials. *Current Opinion in Colloid and Interface Science, 18*(4), 324-333. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.03.009
29. Patel, K.K., Kumar, P., & Thakkar, H.P. (2012). Formulation of niosomal gel for enhanced transdermal lopinavir delivery and its comparative evaluation with ethosomal gel. *AAPS PharmSciTech 13*(4), 1502–1510. https://doi.org/10.1208/s12249-012-9871-7

30. Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M., & Babazadeh, A. (2016). Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. *Food Bioscience, 13*, 49-55. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.002
31. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition, 50*(3), 586-621. https://doi.org/10.1002/anie.201000044
32. Ramli, N., Ali, N., Hamzah, S., & Yatim, N. (2021). Physicochemical characteristics of liposome encapsulation of stingless bees' propolis. *Heliyon, 7*(4). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06649
33. Ravaghi, M., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sinico, C., & Fadda, A.M. (2016). Stabilization of natural canthaxanthin produced by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 by encapsulation in niosomes. *LWT, 73*, 498-504. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.027
34. Seyedabadi, M.M., Rostami, H., Jafari, S.M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food Bioscience, 40*, 100857. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100857
35. Sguizzato, M., Esposito, E., & Cortesi, R. (2021). Lipid-based nanosystems as a tool to overcome skin barrier. *International Journal of Molecular Sciences, 22*(15), 8319. https://doi.org/10.3390/ijms22158319
36. Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., & Huang, Q. (2018). Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules, 107*, 1800-1810. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.044
37. Shahidi, F., & Naczk, M. (2003). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press. https://doi.org/10.1201/9780203508732
38. Shahidi, F., & Yeo, J. (2016). Insoluble-bound phenolics in food. *Molecules, 21*(9), 1216. https://doi.org/10.3390/molecules21091216
39. Sozer, N., & Kokini, J.L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology, 27*(2), 82-89. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010
40. Subramaniam, P. (2016). The stability and shelf life of confectionery products. In The stability and shelf life of food (pp. 545-573). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100435-7.00019-8
41. Vetrani, C., Rivellese, A.A., Annuzzi, G., Mattila, I., Meudec, E., Hyötyläinen, T., Orešič, M., & Aura, A.M. (2014). Phenolic metabolites as compliance biomarker for polyphenol intake in a randomized controlled human intervention. *Food Research International, 63*, 233-238. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.018
42. Williams, R.J., Spencer, J.P., & Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology and medicine, 36*(7), 838-849. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.01.001
43. Zahedi, Y., Shaddel, R., Salamatian, M., & Szumny, A. (2024). Nanoliposomal encapsulation of *Capparis spinosa* extract and its application in jelly formulation. *Molecules, 29*(12), 2804. https://doi.org/10.3390/molecules29122804